Caldasia 17 (2): 211 - 229, 1993

MICROSPORA (PROTOZOA) EN SIMULIIDAE Y ULTRAESTRUCTURA DE *POLYDISPYRENIA SIMULII* Y *POLYDISPYRENIA* SP. NOV. PARASITOS EN SIMULIDOS DE LOS ANDES COLOMBIANOS*

Orlando Torres Fernández
Instituto Nacional de Salud, Sección de Diagnóstico, Investigación y Referencia. Autopista Eldorado Carrera 50, Santafé de Bogotá, D. C., Colombia.

Paulina Muñoz de Hoyos
Instituto Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Apartado 7495, Santafé de Bogotá, D. C., Colombia.

Gloria Romero de Pérez
Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Apartado 23227, Santafé de Bogotá, D. C., Colombia.

Resumen
Se describe la estructura fina de dos microsporidios parásitos de simúlidos de la región de La Calera (2.950 m alt.), cerca a Santafé de Bogotá. *Polydispyrenia simulii* fue hallada infectando larvas de *Simulium ignescens* y *Polydispyrenia norandina* sp. nov. parasitando una larva de *Gigantodax ortizi.* Las dos especies presentan esporas agrupadas en gran número dentro de una vesícula esporofórica (familia Pleistophoridae). *Polydispyrenia simulii*, parásito cosmopolita de larvas de simúlidos es hasta ahora la única especie conocida de este género. Dos características ultraestructurales importantes permiten identificar a *P. simulii*: a) Presencia de unas estructuras cilíndricas peculiares que rodean a los esporoblastos en la cavidad de la vesícula esporofórica (espacio episporontal), las cuales se observan como anillos de pared gruesa en secciones transversales. b) Número constante de 5-6 vueltas en espiral del filamento polar dentro de la espora madura. *Polydispyrenia norandina* sp. nov. exhibe productos metabólicos que se aprecian como manchas electrodensas alrededor de los esporoblastos en el espacio episporontal y un número de 8 vueltas del filamento polar tanto en los esporoblastos como en las esporas maduras.

Abstract
We describe the ultrastructure of two microsporidia parasites of simuliids of the region of La Calera (2.950 m alt.), near Bogotá. *Polydispyrenia simulii* was found infecting larvae of *Simulium ignescens* and *Polydispyrenia norandina* sp. nov., infecting a larva of *Gigantodax ortizi.* The two species present large number of spores aggregated within a sporophoric vesicle, characteristic of the family Pleistophoridae. *Polydispyrenia simulii*, a cosmopolitan parasite of simuliid larvae, has until now been the only known species of this genus. Two ultrastructural characters permit identification of this species: a) Presence of peculiar cylindrical structures surrounding the sporoblasts in the cavity of the sporophoric vesicle (episporontal space); in cross section these structures look like thick-walled rings: b) Consistently 5-6 coils of the polar filament inside the mature spore. *Polydispyrenia norandina* sp. nov. shows metabolic products within the episporontal space that appear as electrodense spots and 8 coils of the polar filament, both in the sporoblasts and in the mature spores.

* Resultados parciales fueron presentados en la I Reunión Latinoamericana sobre simúlidos en La Cumbre, Cordoba, Argentina, por uno de los autores (P.M. de H.) en diciembre de 1991, gracias a la ayuda financiera de Colciencias.

Introducción

Los microsporidios patógenos de insectos han merecido gran atención debido a su potencial utilización en control biológico de plagas y vectores (McLaughlin, 1971; Henry, 1981). Las publicaciones sobre Microspora de insectos son numerosas e incluyen los resultados de investigaciones relacionadas con sistemática, ultraestructura, patología, bioquímica,

genética, epizootiología, producción masiva y preservación de esporas y su aplicación en el campo.

La posición taxonómica de Microspora ha sido objeto de varias revisiones. Durante mucho tiempo se les consideró como orden de la clase Sporozoa, Phylum Protozoa (Weiser, 1963). Sprague (1970) conceptúa que no tienen afinidad con los demás protozoarios y propone la creación del subphylum Microspora. Posteriormente el mismo autor en 1977 lo eleva a la categoría de phylum. Esta propuesta es aceptada por los protozoólogos en la revisión más reciente de la clasificación de protozoarios (Levine *et al.*, 1980).

Durante mucho tiempo predominaron como criterios diagnósticos únicamente aquellos detectados mediante el microscopio de luz tales como: ciclo de vida, forma y tamaño de la espora y número de esporas que se agrupan dentro de una estructura denominada vesícula esporofórica (Thompson 1960a; Weiser y Briggs, 1971).

La microscopía electrónica ha permitido un mayor conocimiento de Microspora y actualmente, el estudio de la estructura fina es indispensable en la taxonomía de este grupo importante de patógenos (Loubès, 1979; Hazard *et al.*,1981; Larsson 1986 a,b).

El propósito de este trabajo fue el de identificar las especies de microsporidios que parasitan larvas de simúlidos de la región de La Calera (Cundinamarca, Colombia), con base en características ultraestructurales. Aspectos generales sobre las infecciones causadas por éstos y otros patógenos se describen en publicación separada (Torres *et al.*, 1991).

Microspora en la familia Simuliidae

El primer diagnóstico de microsporidiosis en la familia Simuliidae fue realizado por Lèger (1897) en tejido adiposo de *Simulium ornatum*. Lutz y Splendore (1904,1908), en sus investigaciones sobre microsporidios en simúlidos y otros insectos en Brasil, mencionan infecciones y describen algunas especies de estos patógenos.

Strickland (1911, 1913) y Debaisieux (1919, 1926) contribuyeron con las primeras investigaciones de microsporidios de simúlidos en la región Holártica. Thompson (1960b) incluyen su revisión 9 de las especies de microsporidios de simúlidos que se reconocen ahora como válidas. Maurand (1975) hace una breve descripción de las 19 especies de los microsporidios de simúlidos conocidas hasta ese año.

De acuerdo con la literatura revisada sobre Microspora en la familia Simuliidae se conocen unas 23 especies de microsporidios, patógenos en representantes de la familia Simuliidae, los cuales se relacionan a continuación siguiendo el sistema propuesto por Sprague (1977) y aceptado por los protozoólogos (Levine *et al.*, 1980).

Se incluyen solamente caracteres diagnósticos de las familias utilizados para clasificar las especies que parasitan simúlidos. Todas ellas pertenecen a la clase Microsporea y al orden Microsporida.

Suborden: APANSPOROBLASTINA Tuzet, Maurand, Fize, Michel, Fenwick, 1971.

Esporas libres no encerradas dentro de una vesícula esporofórica.

Familia: CAUDOSPORIDAE Weiser, 1958.

Esporas con prolongación caudal.

Caudospora simulii Weiser, 1947
Caudospora pennsylvanica Beaudoin y Wills, 1965
Caudospora alaskensis Jamnback, 1970
Caudospora nasiae Jamnback, 1970
Caudospora polymorpha (Strickland, 1911) Maurand, 1975

Esta familia está representada por un solo género, *Caudospora*, exclusivo para microsporidios patógenos de simúlidos.

Familia: NOSEMATIDAE Labbè, 1899

Esporas sin prolongación caudal.

Nosema stricklandi Jírovec, 1943
Weiseria laurenti Doby y Saguez, 1964
Weiseria sommermanae Jamnback, 1970
Hirsutusporos austrosimulii Batson, 1983.

Los géneros *Weiseria e Hirsutusporos* son microsporidios exclusivos para simúlidos.

Suborden: PANSPOROBLASTINA Tuzet, Maurand, Fize, Michel, Fenwick, 1971.

Esporas encerradas dentro de una vesícula esporofórica.

Familia: THELOHANIIDAE Hazard y Oldacre, 1975.

Vesícula esporofórica que contiene 8 ó 16 esporas; presenta un solo tipo de espora.

Thelohania varians (Lèger, 1897) Debaisieux, 1919
Thelohania fibrata (Strickland, 1913) Debaisieux y Gastaldi, 1919
Thelohania columbaczensis Weiser, 1960
Pegmatheca simulii Hazard y Oldacre, 1975
Hyalinocysta expilatoria Larsson, 1983a
Bohuslavia simulii (Maurand y Manier, 1968a) Larsson, 1985

El género *Pegmatheca* es exclusivo para microsporidios de simúlidos.

Familia: AMBLYOSPORIDAE Weiser, 1977

Vesícula esporofórica contiene 4 u 8 esporas; dos tipos de esporas que difieren en tamaño y ultraestructura.

Amblyospora bracteata (Strickland, 1913) Hazard y Oldacre, 1975
Amblyospora capillata (Larsson, 1983b) Larsson, 1987

Familia: TUZETIIDAE Sprague, Tuzet & Maurand, 1977

Vesícula esporofórica encierra solamente una espora.

Janacekia debaisieuxi (Jírovec, 1943) Larsson, 1983c.
Janacekia undinarum Larsson, 1983c.

El género *Janacekia* es exclusivo de microsporidios que afectan simúlidos.

Familia: PLEISTOPHORIDAE Stempell, 1909

Vesícula esporofórica encierra un número irregular de esporas, generalmente mayor de 32.

Polydispyrenia simulii (Lutz y Splendore, 1908), Canning y Hazard, 1982

El género *Polydispyrenia* es exclusivo para microsporidios parásitos de simúlidos.

Existen tres especies que también forman vesícula esporofórica pero debido a que no se tienen los conocimientos suficientes para establecer plenamente su status taxonómico, no es posible ubicarlas dentro de alguna familia: *Octosporea simulii,* Debaisieux, 1926, *Culicospora damnosi* Weiser y Prasertphon, 1982 y *Microsporidium rubtsovi* (Issi, 1968) Sprague, 1977.

No todas las especies de microsporidios de simúlidos han sido estudiadas mediante microscopia electrónica, por lo tanto pueden esperarse cambios en la taxonomía a la luz de nuevos conocimientos.

Las investigaciones sobre microsporidios patógenos de simúlidos han sido principalmente de tipo taxonómico. Se debe a la escuela francesa de la Academia de Montpellier las mayores contribuciones al conocimiento de aspectos tales como citoquímica, patología, genética y ecología de microsporidios de simúlidos.

Maurand (1967) y Murand & Manier (1968b) efectúan estudios histopatológicos y de especificidad parásito-hospedero; ellos comprueban que varias especies de simúlidos pueden hospedar una misma especie de microsporidio y que el patógeno tiene preferencia por el tejido adiposo de la larva aunque es posible localizarlo en otros tejidos.

Maurand (1973) presenta como tesis de doctorado el estudio más completo conocido hasta ahora sobre microsporidios en simúlidos. Posteriormente, el mismo autor publica una revisión como complemento a su trabajo anterior (Maurand, 1975). Además de los estudios taxonómicos, citoquímicos e histopatológicos, el autor hace un análisis de la acción del patógeno sobre el crecimiento de la larva y su actividad respiratoria. El investigador francés señala que las larvas infectadas crecen más que las larvas sanas, e incrementan su longevidad. Esto se debe a la acción juvenilizante del patógeno, el cual afecta la metamorfosis impidiendo al insecto alcanzar las etapas de pupa y adulto. La hipertrofia del tejido adiposo está relacionada con estos efectos juvenilizantes del microsporidio.

Otro aspecto importante del trabajo de Maurand se relaciona con la influencia de los factores ambientales sobre la incidencia de la microsporidiosis en larvas de simúlidos. Asegura que la tasa de parasitismo es independiente de la velocidad de la corriente, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en el agua. No obstante sostiene que las crecientes hacen desaparecer la infección por cuanto arrastran larvas, huevos y las mismas esporas del patógeno. Por lo tanto deben existir otras vías de transmisión de la infección, distinto al de la ingestión de esporas por vía oral. Así, la transmisión vertical es indispensable para mantener el patógeno en la población.

El mecanismo de transmisión de la infección por microsporidios en simúlidos no se conoce aún. No ha sido posible inducir la infección por vía oral en larvas cultivadas en laboratorio (Vavra & Undeen, 1980 en Vavra & Undeen, 1981). Undeen (1981) ensayó infección experimental en larvas de *Simulium vittatum* con esporas de *Janacekia debaisieuxi*. Trabajó con larvas de último instar con el propósito de obtener infección en los adultos, suponiendo que la disolución del intestino larval podría estimular la germinación de la espora y así aparecer la infección en el adulto. En las hembras adultas examinadas se encontraron plasmodios de microsporidios, pero sin poder demostrar que estos estados vegetativos correspondieran a la especie *J. debaisieuxi*. Aunque Undeen no pudo comprobar la infección por vía oral, su trabajo es importante por cuanto se trata del único informe conocido de infección por microsporidios en adultos de simúlidos. Además la microsporidiosis fue hallada en hembras, por lo tanto podría ser una evidencia en favor de la transmisión vertical.

Las hembras de los mosquitos desarrollan la fase esporogónica del microsporidio solamente en los ovarios para asegurar la transmisión vertical del patógeno (Andreadis, 1985), por lo tanto, lo normal es encontrar estados vegetativos en hembras jóvenes. La observación de Undeen (1981) en las hembras de *Simulium vittatum* podría hacer pensar que algo similar ocurre con los microsporidios de simúlidos.

Teniendo en cuenta que en las larvas de mosquitos la fase esporogónica se desarrolla solamente en los machos, Undeen *et al.* (1984) estudiaron el sexo de larvas de simúlidos recolectadas en el campo e infectadas con microsporidios, para establecer si algo similar ocurría en este grupo. Las especies estudiadas fueron' *S. vittatum* infectada con *Janacekia debaiseiuxi, Prosimulium mixtum* con *Caudospora simulii* y *S. venustum* con *Polydispyrenia simulii.* Los resultados fueron sorprendentes. Las infecciones con esporas se encontraron tanto en machos como en hem-

bras. Puesto que estas infecciones son letales para las larvas, no es posible que las hembras lleven la infección hasta el adulto. Así, los investigadores sugieren que la transmisión horizontal es más eficiente para mantener el patógeno en la población, contrariamente a lo propuesto por Maurand (1973).

El enigma del mecanismo de transmisión de las esporas continúa siendo un obstáculo en las investigaciones dirigidas hacia la utilización de microsporidios en control biológico de simúlidos (Weiser & Undeen, 1981).

Microspora en simúlidos del Neotrópico

Lutz y Splendore (1904 y 1908) encuentran *Amblyospora bracteata, Thelohania fibrata y Polydispyrenia simulii* en *Simulium pertinax* y/o *S. perflavum* en Brasil.

Moncada y Bueno (1977) diagnostican microsporidiosis en *Simulium ignescens, S. muiscorum y Gigantodax ortizi* de la región de La Calera.

Marino et al. (1980) registran *Polydispyrenia simulii* en *Simulium annulatum, S. perflavum, S. romanai, S. rubiginosum y S. wolffhuegeli* en la región austral de América.

Takaoka (1980), en Guatemala, señala *Amblyospora bracteata* en el complejo *Simulium metallicum,* en el complejo *S. ochraceum* y *Gigantodax wrighti; Thelohania fibrata* en el complejo *S. metallicum,* en el complejo *S. ochraceum, S. nigricorne, S. paynei, S. quinquestriatum, S. rubicundulum, S. tricorne; Janacekia debaisieuxi* en *S. arakawae, S. callidum; Polydispyrenia simulii* en el complejo *S. metallicum, S. downsi, S. earlei*, en el complejo *S. ochraceum, S. pulverulentum* y *S. rubicundulum.*

Castaldi y Gutiérrez (1981), en México, registran *Janacekia debaiseiuxi* y *Polydispyrenia simulii* en el complejo *Simulium ochraceum.*

García et al. (1989) hallan en Argentina *Amblyospora bracteata* en *Gigantodax brophy, G. chilensis, G. fulvescens, G. rufescens, G. rufidulus, Simulium bonaerense, S. rubiginosum, S. wolffhuegeli; Polydispyrenia simulii en S. bonaerense, S. limay y S. rubiginosum.*

Hernández (1990) llevó a cabo estudios de microsporidios con microscopia de luz y ME en simúlidos de la región alto - andina de Chisacá (Usme, Cundinamarca). Encontró tres especies de microsporidios, entre ellas, *Polydispyrenia simulii* parasitando algunas especies de los géneros *Simulium y Gigantodax.*

Castello Branco y Andrade (1991 a y b) determinan la prevalencia de *Polydispyrenia simulii* en *Simulium pertinax, S. subpallidum* y *S. pruinosum* y llevan a cabo estudios de sintomatología, histopatología y bionomía de *Polydispyrenia simulii* en el Brasil.

Materiales y métodos

Las larvas de simúlidos identificadas e infectadas con microsporidios se procesaron para microscopía electrónica de transmisión, utilizando la doble fijación glutaraldehido-tetróxido de osmio, deshidratación en etanol, infiltración en etanol: Spurr (1:1) e inclusión en resina Spurr. Se obtuvieron secciones finas (500 Å), empleando cuchillas de vidrio, en un ultramicrótomo de avance térmico LKB, las cuales se colocaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo durante 10 minutos y citrato de plomo 10-20 minutos. Las observaciones se hicieron en un microscopio JEOL 100B con voltaje de aceleración de 60 kv. Se obtuvieron secciones semifinas de 1 μ, éstas se colorearon con azul de toluidina y se observaron en un microscopio de luz convencional.

A partir de larvas de *Simulium ignescens* infectadas con microsporidios y preservadas en etanol 70%, se prepararon frotis, los cuales se colorearon con solución Giemsa (Fisher) 1:25 en buffer fosfato durante 10 minutos. El diámetro y la longitud de las esporas se obtuvieron utilizando un microscopio amplival Zeiss Jena, con aditamento de micrometría.

Resultados y discusión

Dos especies de Microspora se hallaron en las larvas de simúlidos de la región de La Calera. A continuación se presentan las observaciones detalladas de cada especie, acompañadas con electromicrografías para facilitar su identificación.

Polydispyrenia simulii (Lutz y Splendore, 1908), Canning y Hazard, 1982
Nosema simulii Lutz y Splendore, 1908
Glugea multispora Strickland, 1913
Pleistophora simulii Jírovec, 1943
Pleistophora multispora Vavra y Undeen, 1981

El único hospedero de *Polydispyrenia simulii* en la región estudiada fue *Simulium ignescens* Roubaud, 1906; la incidencia del parasitismo fue relativamente alta, de 3.432 larvas, 124 estuvieron parasitadas (3.6%). El parásito forma masas tumorales (xenomas) en el tejido adiposo de la larva infectada. Los xenomas, en sección, indican maduración centrípeta de las esporas y éstas se agrupan en gran número formando estructuras semejantes a mórulas (Torres, 1988; Torres *et al.*, 1991) características de la familia Pleistophoridae.

Las esporas libres de *P. simulii* se aprecian en la figura 1. El tamaño de éstas, en material fijado en etanol, es en promedio 4.98µ (4.18-5.89µ ; n=50) de longitud y 3.0µ (2.47-3.75µ; n=50) de diámetro. Hernández (1990) registra para la misma especie esporas con promedios de 5.30µ de longitud y 2.98µ de diámetro, medidas tomadas en esporas frescas (n=50). El plasmodio esporogonial se divide mediante el proceso de plasmotomía, es decir, por fragmentación sucesiva (fig.2). Esta característica también se observa en la figura No. 4 del trabajo de Torres *et al.*, 1991.

Antes de iniciar su división el plasmodio esporogonial se recoge, iniciándose así la separación entre el plasmalema y una membrana fina exterior no celular (figs. 2 y 3), la membrana de la vesícula esporofórica, dentro de la cual se desarrollan las etapas sucesivas del ciclo de vida del patógeno.

Canning & Hazard (1982) señalan diferencias importantes en la ultraestructura de la vesícula esporofórica de los tres géneros en que ellos dividieron a las especies de la familia *Pleistophoridae* (tabla 1). *Pleistophora* y *Vavraia* tienen vesícula esporofórica rodeada de una pared compuesta por material amorfo, mientras que en *Polydispyrenia* solo está constituida por una membrana fina (fig. 3). En *Pleistophora* y *Vavraia* la vesícula esporofórica se forma a partir del palsmodio merogonial. En *Polydispyrenia* aparece al iniciarse la esporogonia, tal como se ve en la figura 2. Canning & Hazard (1982) utilizan las expresiones «vesícula esporofórica merontogénica» y «vesícula esporofórica esporontogénica» para referirse a los dos casos.

Durante la fase esporogonial de *Polydispyrenia simulii* se observan unas inclusiones tubulares muy peculiares. Estas estructuras inicialmente se localizan hacia la periferia del plasmodio esporogonial (figs. 2 y 3), pero al final de la esporogonia se distribuyen entre los esporoblastos y las esporas maduras. Las inclusiones tubulares de este tipo se conocen hasta ahora exclusivamente en *P. simulii*, patógeno cosmopolita de varias especies de simúlidos (Maurand, 1973, 1975; Maurand & Loubès, 1978; Canning & Hazard, 1982; Larsson, 1986a). No se han observado en otro microsporidio de simúlidos ni en ninguna especie del phylum Microspora. El origen y la función de estas estructuras no se conoce.

Así mismo, se aprecian fibras alrededor de las inclusiones tubulares presentes en el plasmodio esporogonial (fig.3) que no aparecen durante el posterior desarrollo de la esporogonia. Estas fibras se observan en las imágenes de *P. simulii* del trabajo de Canning & Hazard (1982), al desaparecer, según los mismos autores, parte de ellas se unen al plasmalema de los esporoblastos haciéndolo más electrodenso, tal como se puede ver en las figuras 4 y 5.

Los esporoblastos jóvenes (figs. 4 y 5) presentan una membrana celular muy electrodensa. Se observan además gránulos de productos metabólicos dispersos entre los esporoblastos (fig.4). Estos gránulos son ca-

racterísticos de los microsporidios al iniciarse la esporogénesis. Maurand y Bouix (1969) sugieren la existencia de alguna relación entre este fenómeno y la producción de sustancias de acción juvenilizante responsables de impedir el curso normal de la metamorfosis de la larva para alcanzar el estado adulto, de acuerdo con la hipótesis de Fisher y Sanborn (1962). Maurand y Loubès (1973) estudiaron estos productos de secreción mediante pruebas citoquímicas y concluyeron que se trata de sustancias protéicas con numerosos grupos -SH. Además establecieron que éstas son las únicas sustancias metabólicas que se detectan en las electromicrografías al utilizar los procedimientos convencionales de fijación, inclusión y contrastado. Hallaron otros compuestos pero únicamente con indicadores histoquímicos para microscopía de luz.

Dentro de los esporoblastos se nota ya el filamento polar aún no organizado en espiral (fig. 4) así como la presencia de un sólo núcleo (fig. 5). El abundante retículo endoplasmático que rodea al núcleo, indica una gran actividad metabólica de las células del patógeno al iniciarse la esporogénesis.

Las figuras 4 y 5, aunque corresponden a etapas del desarrollo del parásito muy similares, revelan diferentes detalles. Esto se debe probablemente a variaciones en los procedimientos de fijación, inclusión y contrastado, diferencias frecuentes en la literatura.

Los esporoblastos avanzados (fig. 2) se caracterizan por ser electrodensos, debido a la acumulación de quitina y otras sustancias protéicas que aparecen durante la formación

Tabla 1. Caracteres diagnósticos para los géneros de la familia Pleistophoridae

Pleistophora Gurley, 1893	*Vavraia* Weiser, 1977	*Polydispyrenia* Canning & Hazard, 1982
Un solo núcleo durante todo el ciclo de vida	Un solo núcleo durante todo el ciclo de vida	Merogonia diplocariótica. Esporogonia uninucleada
Plasmodio merogonial rodeado por una sustancia amorfa, adyacente al plasmalema y atravesada por canales.	Plasmodio merogonial envuelto en un material amorfo, adyacente al plasmalema, sin canales	Plasmodio merogonial, rodeado por un plasmalema simple
Vesícula esporofórica merontogénica, constituida por tres o más capas que le dan gran consistencia.	Vesícula esporofórica merontogénica, con membrana compuesta por dos capas.	Vesícula esporofórica esporontogénica, con membrana delgada y simple.
Plasmodio esporogonial se divide por plasmotomía.	Plasmodio esporogonial se divide por esquizogonia	Plasmodio esporogonial se divide por plasmotomía
Filamento polar isofilar*	Filamento polar anisofilar**	Filamento polar isofilar
Característico de vertebrados	Se encuentra sólo en insectos	Hasta ahora exclusivo para simúlidos

* Isofilar: filamento de diámetro uniforme desde la base hasta el extremo.
** Anisofilar: filamento que se estrecha bruscamente hacia la pared distal.
Fuentes: Canning & Hazard (1982), Larsson (1986 a,b), Malone *et al.*, (1987).

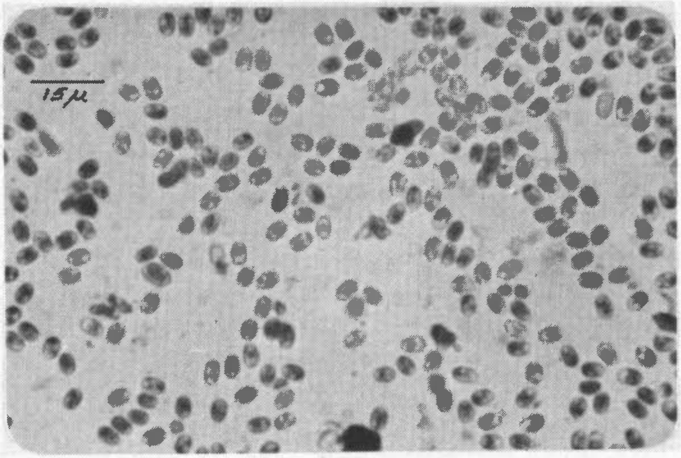


Figura 1. Esporas libres de *Polydispyrenia simulii*. Etanol-Giemsa.

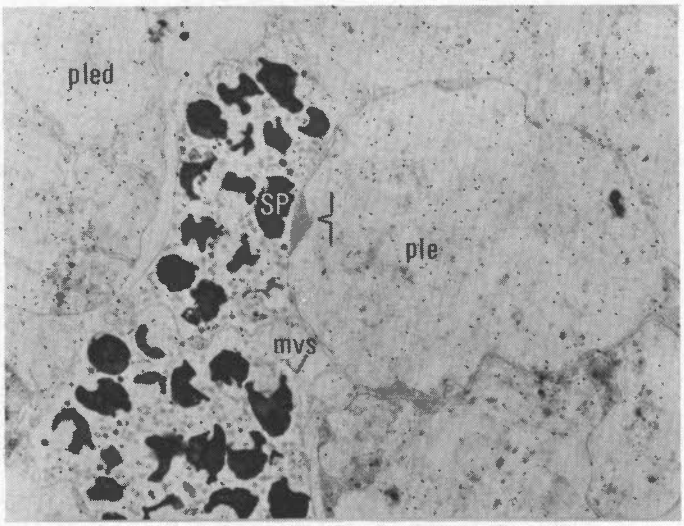


Figura 2. Plasmodio esporogonial (ple) y plasmodio esporogonial en división (pled) de *Polydispyrenia simulii* parásito de *Simulium ignescens*, mostrando la división entre el plasmalema y la membrana de la vesícula esporofórica. Se distinguen pequeñas inclusiones entre los esporoblastos (SP) y la membrana de la vesícula esporofórica (mvs). 2666X.

de la pared de la espora (Ericksson & Sprague, 1970; Maurand & Loubès, 1973).

El contorno irregular que adquieren los esporoblastos avanzados, es común. Sprague y Vernick (1968) se refieren a este fenómeno con la expresión «crenulation» y sugieren que puede tratarse de un artefacto de fijación.

Los esporoblastos avanzados generalmente enseñan las características que llevará la espora madura, por lo tanto, se han utilizado en la descripción de especies nuevas cuando no ha sido posible obtener nuevas imágenes de la espora madura (Weiser, comunicación personal). En mayor aumento (fig. 6) uno de estos esporoblastos muestra rasgos semejantes a

los de la espora madura, tales como 5 vueltas del filamento polar y la formación de la pared.

Las muestras con esporas maduras generlamente ofrecen dificultades para obtener secciones ultrafinas por la presencia de quitina en la pared. La exospora en la espora madura se caracteriza por ser muy gruesa y electrodensa (fig.7).

Interpretación taxonómica. Maurand y Loubès (1978) en su revisión de la ultraestructura de microsporidios de larvas de simúlidos inician el análisis para *Polydispyrenia simulii* con el siguiente comentario: «Los datos ultraestructurales concernientes a esta especie son muy fragmentarios...». Las principales características allí mencionadas son: plasmodio merogonial con numerosos núcleos diplocarióticos, inclusiones tubulares características de la especie, esporogénesis uninucleada y filamento polar con 5-6 vueltas en espiral.

En el presente trabajo no se observaron los núcleos diplocarióticos debido a que sólo se encontraron infecciones avanzadas y tales estructuras únicamente aparecen durante la fase merogonial. Imágenes de los plasmodios merogoniales con núcleos diplocarióticos de *P. simulii* se exhiben en los informes de Maurand y Loubès (1978) y Canning y Hazard (1982). La presencia de estos núcleos motivó a Canning y Hazard (1982) a adoptar la nueva combinación *Polydispyrenia simulii* (del griego poly=muchos, dis=doble y pyren=núcleo) para la especie hasta ahora conocida como *Pleistosphora simulii.* Los otros géneros de familia Pleistophoridae (*Pleistophora y Vavraia*) son uninucleados durante todo el ciclo de vida (tabla 1).

La ultraestructura de la espora madura de *P. simulii* ha sido poco estudiada debido a que ofrece gran dificultad para cortar. De acuerdo con las fotografías y la información suministrada por Maurand (1975) y Maurand y Loubès (1978), imágenes ultraestructurales de esporoblastos avanzados, como las obtenidas en este trabajo, que señalan el número de vueltas del filamento polar, son difíciles de lograr. Maurand (1973) establece el número de vueltas del filamento polar con base en observaciones al microscopio de luz y no ultraestructurales, según sus propias palabras: «el rastro de espiralización que persiste después de la salida del filamento indica 6 vueltas».

En las revisiones de Maurand (1975) y Maurand y Loubès (1978) no aparecen electromicrografías de la espora madura de *P. simulii.* Canning y Hazard (1982) no aportan información sobre la espora madura de esta especie. Ellos afirman «La estructura de la espora no se preservó bien en nuestro material».

No se han publicado trabajos posteriores relacionados con la ultraestructura del *P. simulii.* Larson (1986 a,b) incluye datos ultraestructurales de la espora madura, según él, con base en observaciones no publicadas. Sus datos coinciden con los ya conocidos para esta especie. No obstante, en una de sus publicaciones (1986a) se mencionan 8 vueltas del filamento polar; según comunicación personal del Dr. Larsson, se trata de un error mecanográfico, pues el número correcto debió ser 4-6.

En opinión de Maurand (1973) el nombre específico de *P. simulii* se debe a Lutz y Splendore (1908), quienes asignaron el nombre de *Nosema simulii B* a una microsporidio con un número de esporas mayor de 8 por vesícula esporofórica y una longitud de la espora de 4.5 a 5.5µ, encontrado en simúlidos del Brasil. Complementan la información señalando que la especie es de un tipo semejante a las del género *Pleistophora.*

La descripción de Lutz y Splendore (1908) es incompleta teniendo en cuenta los conocimientos actuales. En otras especies de microsporidios patógenos de simúlidos, no pertenecientes a la familia Pleistophoridae, también es posible encontrar un número de esporas mayor de 8 por vesícula esporofórica.

Vavra y Undeen (1981) sostienen que la primera descripción clara de *P. simulii* la hizo

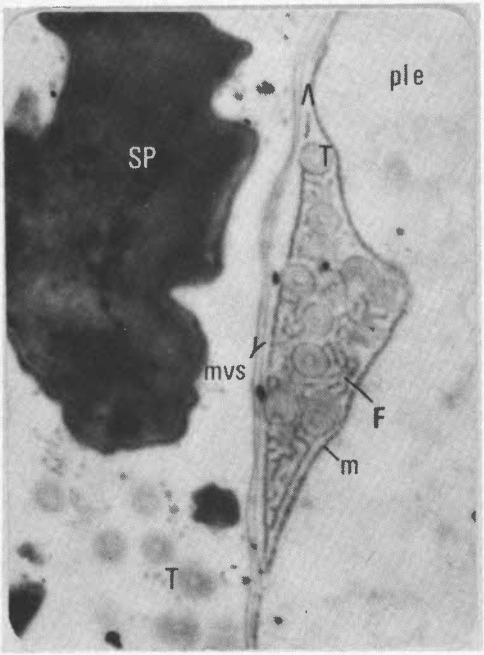


Figura 3. Detalle de la región señalada con corchete en la figura anterior. El signo (^) indica la separación entre el palsmalema (m) del plasmodio esporogonial (ple) y la membrana de la vesícula esporofórica (mvs) mucho más delgada. SP: esporoblastos. T: inclusiones tubulares. F:fibras. 20.000X.

Strickland en 1913; él le dió el nombre de *Glugea multispora*. Con base en una revisión histórica de la sinomia, que incluyó el exámen de láminas de las colecciones de Jírovec y Weiser en Checoeslovaquia, Vavra y Undeen (1981) sugieren la combinación *Pleistophora multispora* como la correcta para esta especie.

Si se acepta la propuesta de estos investigadores y teniendo en cuenta que Canning y Hazard (1982) asignaron esta especie al nuevo género *Polydispyrenia*, entonces la combinación válida actualmente sería *Polydispyrenia multispora*. Sin embargo, el nombre *P. simulii* continúa siendo el más aceptado.

Polydispyrenia norandina sp. nov.

El único hospedero de *Polydispyrenia norandina* sp. nov. en la región estudiada fue *Gigantodax ortizi* Wygodzinsky, 1973; la incidencia del parasitismo fue muy baja, de 303 larvas sólo una estaba parasitada (0.33%). El patógeno induce formación de xenomas en el tejido adiposo de la larva. La maduración de las esporas dentro del xenoma presenta distribución irregular (Torres *et al.*, 1991), diferente de la distribución centrípeta que se observa

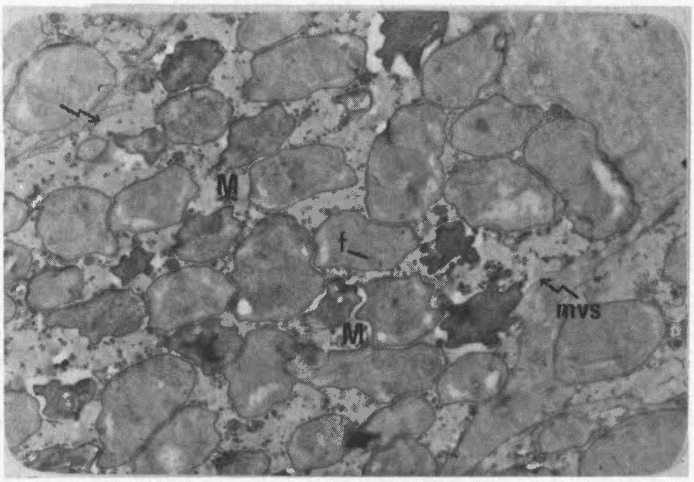


Figura 4. Esporoblastos jóvenes de *Polydispyrenia simulii*. El filamento polar (f) empieza a notarse. M: productos metabólicos. mvs: membrana de la vesícula esporofórica. 5.000X.

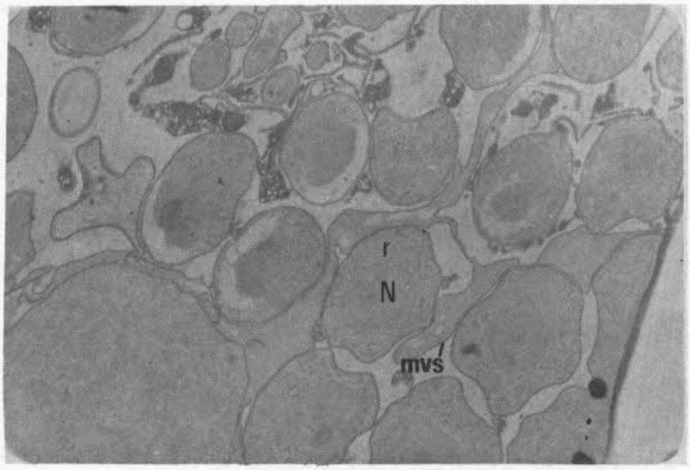


Figura 5. Esporoblastos jóvenes del *Polydispyrenia simulii*. Se manifiestan grandes núcleos (N), abundante retículo endoplasmático (r) y la membrana de la vesícula esporofórica (mvs). 5.000X.

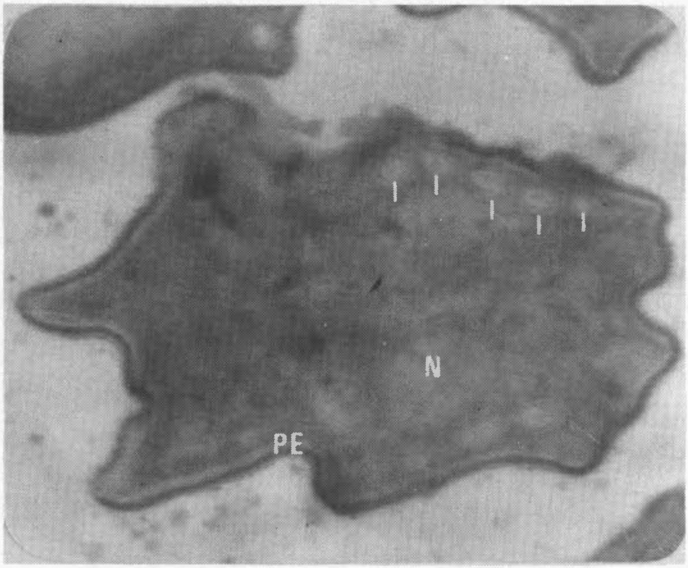


Figura 6. Detalle de un esporoblasto avanzado de *Polydispyrenia simulii*. Las barras verticales señalan el filamento polar en sección transversal describiendo 5 vueltas. Empieza a notarse la formación de la pared de la espora (PE). Hay un solo núcleo (N). 26.666X.

en *P. simulii* (Maurand, 1973; Torres *et al.*, 1991). Las esporas son piriformes; tienen 5μ de longitud y 3μ de diámetro y se observan en grandes grupos de número irregular (fig. 8), característica importante para ubicar la especie dentro de la familia Pleistophoridae.

La ultraestructura revela la presencia de merogonia con núcleos diplocarióticos (figs. 9 y 10) rasgo muy importante en la taxonomía de los microsporidios; en el presente caso es muy significativa ya que dentro de la familia Pleistophoridae únicamente el género *Polydis-*

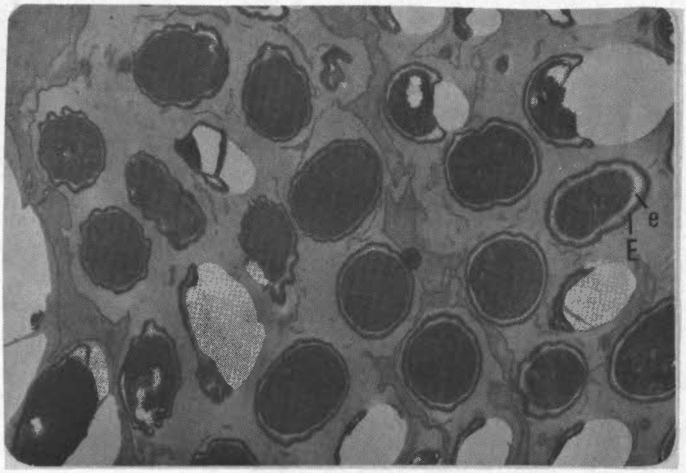


Figura 7. Esporas maduras de *Polydispyrenia simulii*. Son evidentes la endospora electrolúcida (e) y la exospora electrodensa (E). 6.666X.

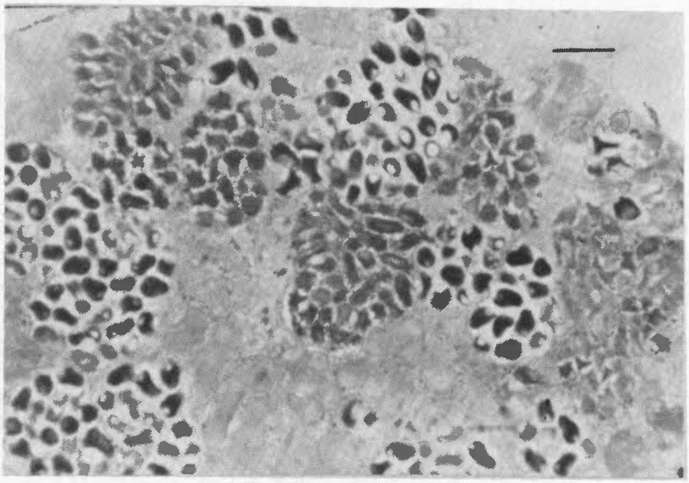


Figura 8. Sección semifina de un xenoma de la microsporidiosis en *Gigantodax ortizi* que muestra diferentes etapas de la esporogonia. La barra equivale a 10µ.

pyrenia posee este tipo de núcleos en el plasmodio merogonial (tabla 1).

La fragmentación del plasmodio esporogonial se lleva a cabo por plasmotomía (fig. 11). Los esporoblastos y esporas formados mediante este proceso son uninucleados (figs. 11 y 14), lo que indica un ciclo de vida con merogonia diplocariótica y esporogonia uninucleada.

Los productos metabólicos distribuidos entre los esporoblastos (figs. 11 y 12) tienen un aspecto diferente al observado para *P. simulii*. En *Polydispyrenia norandina* sp. nov. los productos metabólicos presentan el aspecto de manchas electrodensas (figs. 11 y 12), en *P. simulii* se aprecian como grandes gránulos finos (fig. 4). Los esporoblastos avanzados muestran el filamento polar con ocho vueltas (fig. 13).

En las figuras 14 y 15 se exhiben esporas que muestran detalles muy significativos, el más notable es el número de ocho vueltas que describe el filamento polar. El polaroplasto laminar (fig. 15) es el que se encuentra comúnmente en la mayoría de microsporidios (Larsson, 1986 a,b).

Es importante señalar que las inclusiones tubulares abundantes en la esporogonia de *P. simulii* no se observan en *Polydispyrenia norandina*.

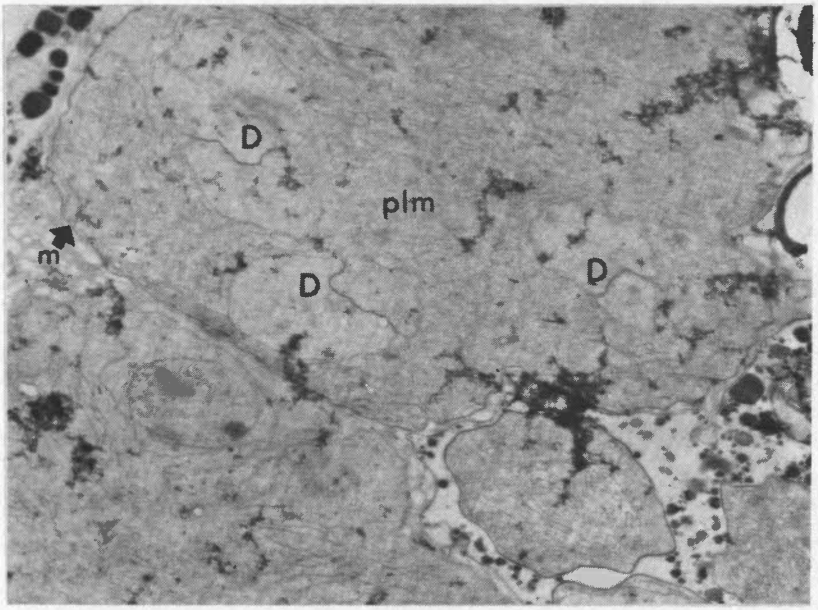


Figura 9. Parte de un plasmodio merogonial (plm) de *Polydispyrenia norandina* sp. nov. parásito de *Gigantodax ortizi* con tres dobles núcleos o diplocariones (D). Solamente el plasmalema (m) rodea al plasmodio. 6.333X.

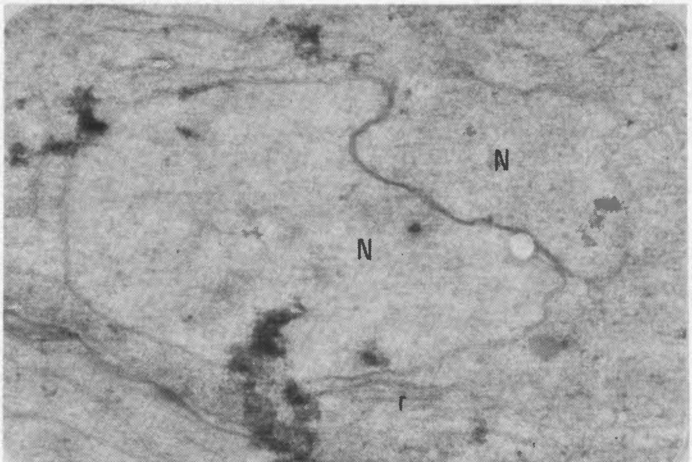


Figura 10. Magnificación de uno de los diplocariones de la figura anterior. Nótese la doble membrana nuclear. N: núcleo. r: retículo endoplasmático. 20.000X

Interpretación taxonómica. El microsporidio encontrado en *Gigantodax ortizi* exhibe las características propias de los miembros de la familia Pleistophridae: vesícula esporofórica que encierra un número irregular de esporas, generalmente más de 32 y del género *Polydispyrenia*: núcleos dobles en la fase vegetativa, división del plasmodio esporogonial por plasmotomía y núcleos simples en las diferentes etapas de la fase esporogonial, así como una vesícula esporofórica formada por una membrana delgada y simple (Canning & Hazard, 1982; Canning *et al.*, 1991).

Hasta ahora, solamente una especie de los microsporidios hallados en simúlidos perte-

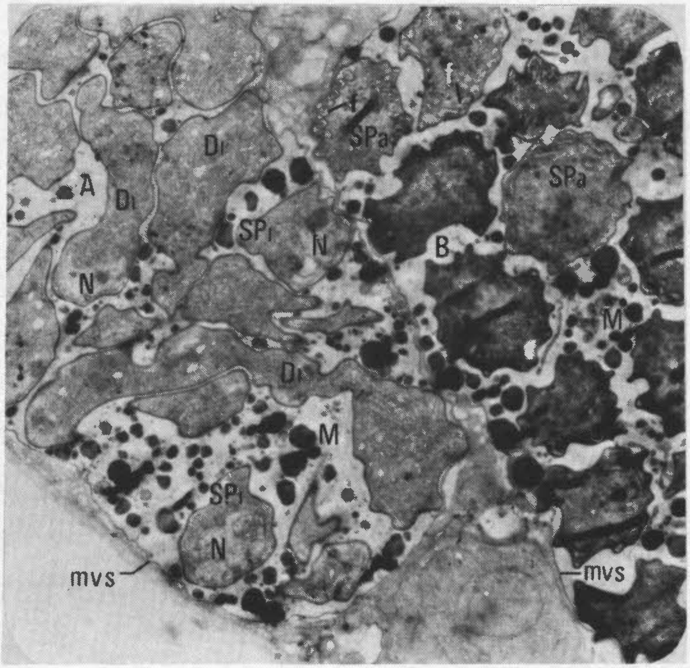


Figura 11. *Polydispyrenia norandina* sp. nov. en *Gigandotax ortizi*. A: vesícula esporofórica que contiene la etapa final de la plasmatomía del plasmodio esporogonial. B: vesícula con esporoblastos avanzados (Spa). Di: restos del plasmodio esporogonial en proceso de fragmentación. Spi: esporoblastos jóvenes. N: núcleo. f: filamento polar. M: productos metabólicos. mvs: membrana de la vesícula esporofórica. 5.000X.

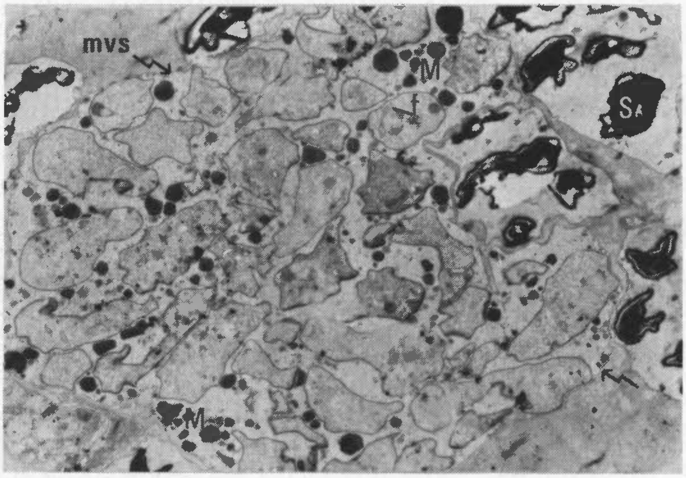


Figura 12. Numerosos esporoblastos jóvenes de *Polydispyrenia norandina* sp. nov. dentro de una vesícula esporofórica. Se nota la aparición del filamento polar (f), aún no organizado, productos metabólicos (M) y la membrana de la vesícula esporofórica (mvs). Arriba a la derecha, esporas maduras (S) muy electrodensas. 3.333X.

nece a esta familia, ella es *Polydispyrenia simulii*. Sin embargo, algunas características morfológicas y ultraestructurales de este otro microsporidio permiten afirmar que se trata de una especie diferente a *P. simulii* y por lo tanto corresponde a una especie nueva para el género, donde el filamento polar muestra ocho vueltas, en la esporogonia no se observan las inclusiones tubulares y los productos metabólicos presentan el aspecto de manchas electrodensas.

El género *Gigantodax* es endémico de las altas montañas de la región neotropical (Wygodzinsky y Coscarón, 1973; Crosskey, 1981). Este aislamiento geográfico podría explicar en parte el hecho de encontrar una

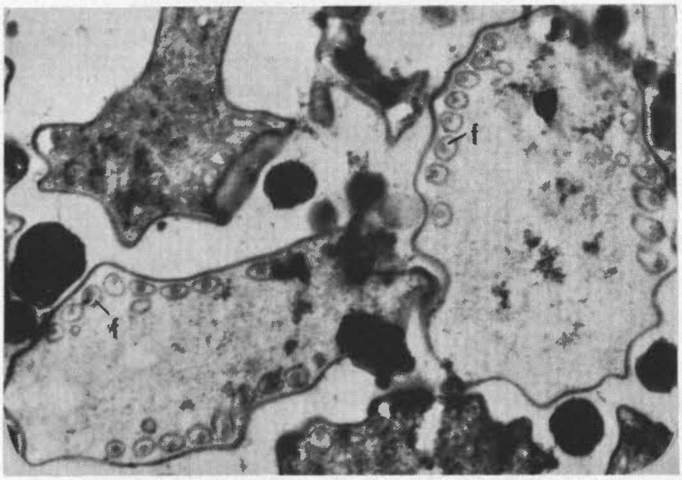


Figura 13. Esporoblastos de *Polydispyrenia norandina* sp. nov. en *Gigantodax ortizi* con filamento polar (f) en sección transversal indicando ocho vueltas en espiral. 10.000X.

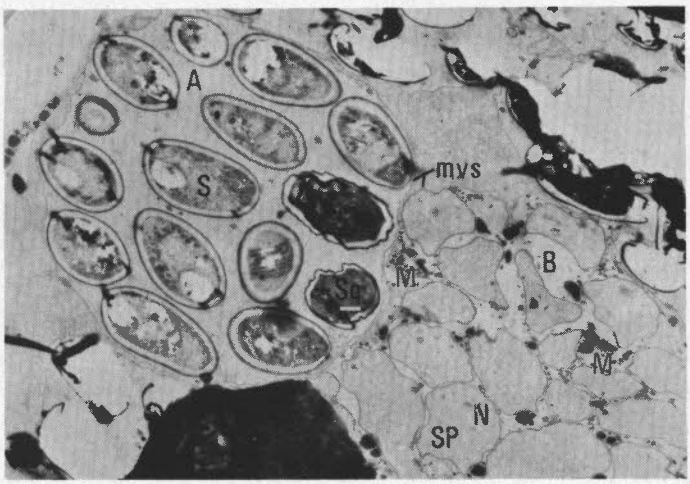


Figura 14. *Polydispyrenia norandina* sp. nov. en *Gigantodax ortizi*. A: Vesícula esporofórica con esporas maduras. B: Vesícula con esporoblastos muy jóvenes. La membrana de la vesícula esporofórica (mvs) es simple y fina. Los esporoblastos (SP) son uninucleados. S: Espora. Sq: Espora quitinizada. N: Núcleo. M: Productos metabólicos. 3.333X.

nueva especie de Microspora perteneciente a un género hasta ahora considerado monotípico y cosmopolita.

Descripción de *Polydispyrenia norandina* Torres, Muñoz de Hoyos y Romero de Pérez, sp. nov.

Lámina tipo: Coloreada con Azul de Toluidina y depositado en la colección de patógenos de simúlidos del Instituto de Ciencias Naturales - Museo Historia Natural, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. Esta lámina proveniente de un solo espécimen incluido en plástico, se designa como **holótipo**.

Láminas adicionales: Tres. Dos láminas depositadas en la misma colección. La otra enviada al Doctor R. Larsson.

Localidad típica: Río Teusacá, La Calera, Cundinamarca, cordillera Oriental 2950 m alt. Colombia.

Etimología: El nombre de la especie es alusivo a la localidad tipo: norte de la cordillera de los Andes.

Hospedero y espécimen tipo. Larva de *Gigantodax ortizi* Wygodzinsky, 1973 recolectada por Orlando Torres el 19 de marzo de 1987.

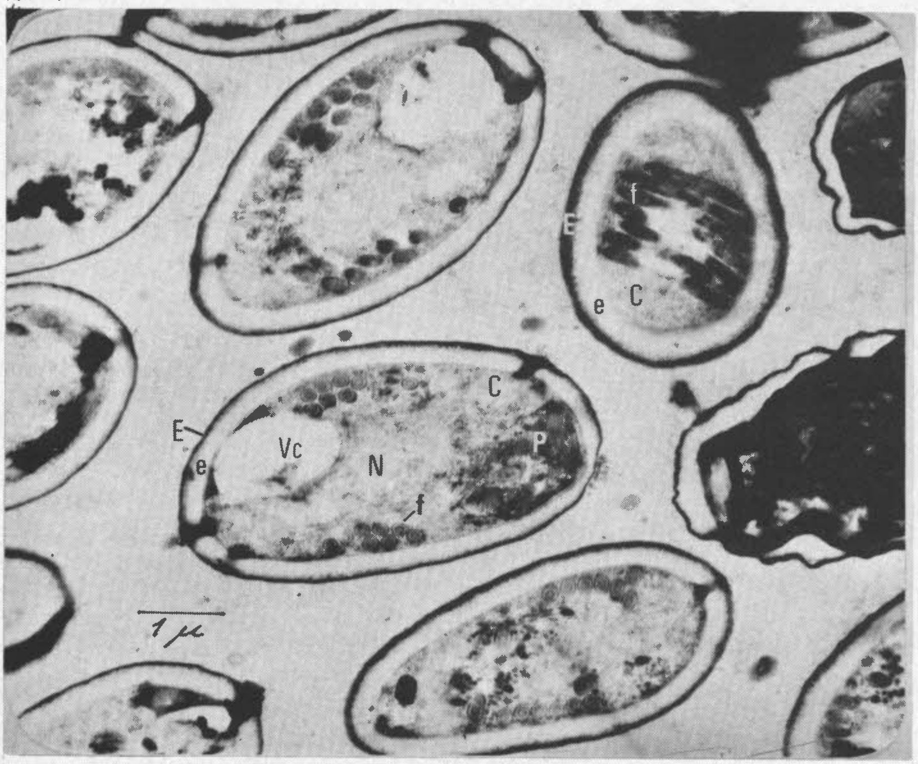


Figura 15. Esporas de *Polydispyrenia norandina* sp.nov. en *Gigantodax ortizi*. El filamento polar (f) en sección transversal, indica ocho vueltas en espiral, su diámetro es uniforme (Isofilar) y puede estar organizado en dos hileras. El polaroplasto (P) es laminar. Arriba a la derecha, sección sagital de una espora que muestra el filamento polar en sentido longitudinal, enrollado hacia la parte media de la espora. E: Exospora. e: Endospora. Vc: Vacuola. N: Núcleo. C: Esporoplasma o citoplasma de la espora. 11.670X.

TEJIDO INFECTADO. Tejido adiposo de la larva.

MORFOLOGÍA. El xenoma presenta diferentes etapas del ciclo de vida distribuidas irregularmente. Las esporas se agrupan en gran número dentro de vesículas esporofóricas (fig. 8).

MEROGONIA. Solamente se observó parte de un plasmodio merogonial con núcleos dobles (diplocariones) y plasmalema simple (figs. 9 y 10).

ESPOROGONIA. Esporoblastos uninucleados originados por plasmotomía del plasmodio esporogonial, dentro de una vesícula esporofórica cuya membrana es simple y muy fina. Se aprecian productos metabólicos en forma de manchas electrodensas. No se observan inclusiones tubulares durante la esporogonia (figs. 11, 12 y 14).

ESPORAS. Piriformes, 5μ de longitud y 3μ de diámetro, calculados sobre electromicrografías. Filamento polar isofilar dispuesto en 1-2 filas, ocupa la parte central de la espora y describe 8 vueltas. Uninucleadas. Polaroplasto laminar (fig. 15).

Agradecimientos

El estudio, incluído dentro del programa «Biología de los simúlidos de Colombia» financiado por Colciencias y la Universidad Nacional de Colom-

bia, fue posible gracias a la ayuda financiera del Cindec.

Los autores desean expresar su agradecimiento a los Doctores Elizabeth Canning, Ronny Larsson, Jaroslav Weiser y Albert Undeen por sus comentarios sobre algunas de las fotografías; a los Doctores Claude Loubès y Jean Maurand por el suministro de material bibliográfico y finalmente a la Bióloga Vianney Castañeda por la colaboración técnica y al Doctor Jorge Hernández Camacho por la revisión del manuscrito.

Literatura citada

ANDREADIS, T. 1985. Life cycle, epizootiology and horizontal transmission of *Amblyospora* (Microspora: Amblyosporidae) in a univoltine mosquito, *Aedes stimulans*. *J. Invert. Pathol.* 46: 31-46.

BATSON, B. 1983. A light and electron microscopic study of *Hyrsutusporos austrosimulii* gen. n., sp. n., (Microspora: Nosematidae), a parasite of *Austrosimulium* sp. (Diptera: Simuliidae) in New Zealand. *Protistologica* 19: 263-280.

BEAUDOIN, R. & W. WILLS. 1965. A description of *Caudospora pennsylvanica* sp. n. (Caudosporidae, Microsporidia), a parasite of the larvae of the *blackfly Prosimulium magnum* Dyar and Shanon. *J. Invert. Pathol.* 7: 152-155.

CANNING, E.U. & E.I. HAZARD. 1982. Genus *Pleistophora* Gurley, 1893: An assemblage of at least three genera. *J. Protozool.* 29: 39-49.

___, KILLIK-KENDRICK, R & M. KILLICK-KENDRICK. 1991. A new Microsporidian parasite, *Flabelliforma montana* n.g., n.sp., infecting *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Psychodidae) in France. *J. Invert. Pathol.* 57: 71-81.

CASTALDI, M.O. & M.O. GUTIÉRREZ. 1981. Contribución al estudio de la bioecología de los simúlidos (Diptera, Simullidae) transmisores de oncocercosis: Entomofauna asociada a las formas larvarias. *Folia Entomológica Mexicana* 50: 97-107.

CASTELLO BRANCO JR. A. & C.F.S. ANDRADE. 1991. Estudios histopatológicos e bionómicos de *Polydispyrenia simulii* (Microspora, Pleistophoridae) em borrachudos (Diptera, Simuliidae). Resumen No. 17. II Congreso Argentino de Entomología, I Seminario Latinoamericano de Vectores Urbanos y Animales Sinantrópicos y I Reunión Latinoamericana sobre Simúlidos. La Cumbre. Córdoba, Argentina. 3-6 Diciembre.

___, C.M. WAIB & C.F.S. ANDRADE. 1991. Prevalencia de *Polydispyrenia simulii* (Microspora, Pleistophoridae) em uma comunidade de borachudos (Diptera, Simuliidae) com estudos de sintomatología. Resumen No. 67. II Congreso Argentino de Entomología, I Seminario Latinoamericano de Vectores Urbanos y Animales Sinantrópicos y I Reunión Latinoamericana sobre Simúlidos. La Cumbre, Córdoba, Argentina. 3-6 Diciembre.

CROSSKEY, R. 1981. Geographical distribution of Simuliidae. Pp 57-68, *in* Laird, M. (Ed.), *Blackflies: The future for biological methods in integrated control.* xii + 399 pp. Academic Press. London.

DABAISIEUX, P. 1919. Microsporidies parasites des larves de *Simulium: Thelohania varians*. *Cellule* 30: 45-79.

___. 1926. A propos d'une microsporidie nouvelle *Octosporea simulii*. *Ann. Soc. Sci. Bruxelles* 46: 594-601.

___ & L. GASTALDI. 1919. Les microsporides parasites des larves de simulies. *Cellule* 30: 187-213.

DOBY, J.M. & F. SAGUEZ. 1964. *Weiseria*, genre nouveau de microsporidies et *Weiseria laurenti* n. sp. parasite de larves de *Prosimulium inflatum* Davies 1957 (Diptères Paranématocères). C.R. *Acad. Sci. Fr.* 259: 3614-3617.

ERICKSON, B. & V. SPRAGUE. 1970. Summary of contributions of cytochemistry to our knowledge of Microsporida. Proc. 4th Int. Colloq. Insect Pathol. College Park. Md. 404-409 pp.

FISHER, F. & R. SANBORN. 1962. Production of insect juvenile hormone by the microsporidian parasite *Nosema*. *Nature* 194: 1193.

GARCÍA. J., E.I. HAZARD & T. FUKUDA. 1989. Preliminary report of Microsporidia in Simuliidae larvae from Argentina. *Journal of American Mosquito Control Association* 5: 64-69.

GURLEY, R. 1893. On the classification of the Myxosporidia, a group of protozoan parasites infecting fishes. *Bull.* U.S. *Fish Comm.* 11: 407-420.

HAZARD, E.I. & S.W. OLDACRE. 1975. Revision of Microsporida (Protozoa) close to *Thelohania*, with descriptions of one new family, eight new genera, and thirteen new species. *Agric. Res. Serv. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull.* No. 1530: iv + 1-104.

___, ELLIS, E. & D. JOSLYN. 1981. Identification of Microsporidia. Pp 163-182, *in* Burges, H., (Ed.) *Microbial Control of pests and plant diseases* 1970-1980. Academic Press, London.

HENRY, J. 1981. Natural and applied control of insects by Protozoa. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 49-73.

HERNÁNDEZ, L. 1990. Estudios preliminares de microsporidios agentes patógenos en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) de la región de Chisacá-Cundinamarca. Trabajo de Grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 42 pp.

Issi, I.V. 1968. *Stempellia rubtsovi* sp. n. (Microsporidia: Nosematidae) a microsporidian parasite of larvae of the blackfly *Odagmia caucasica* larvae (Diptera, Simuliidae). *Acta Protozool.* 6: 345-352.

Jamnback, H. 1970. *Caudospora* and *Weiseria*, two genera of Microsporidia parasitic in blackflies. *J. Invert. Pathol.* 16: 3-13.

Jírovec, O. 1943. Revisión der in *Simulium*-larven parasitierenden. Mikrosporidien *Zool. Anz.* 142: 173-179.

Labbé, A. 1899. Sporozoa. *In:* «Das Tierreich», Lief. 5.0. Bütschli, ed. pp. 1-180. Fridländer, Berlin.

Larsson, R. 1983a. Description of *Hyalonocysta expilatoria* n. sp., a microsporidian parasite of the blackfly *Odagmia ornata*. *J. Invert. Pathol.* 42: 348-356.

____ . 1983b. *Thelohania capillata* n. sp. (Microspora, Thelohaniidae). An ultrastructural study with remarks on the taxonomy of the genus *Thelohania* Henneguy 1892. *Arch. Protistenk.* 127: 21-46.

____ . 1983c. A revisionary study of the taxon *Tuzetia* Maurand, Fize, Fenwick and Michel, 1971, and ralated forms (Microspora, Tuzetiidae). *Protistologica* 19: 323-355.

____ . 1985. On the cytology, development and sistematic position of *Thelohania asterias* Weiser with creation of the new genus *Bohuslavia* (Microspora, Thelohaniidae). *Protistologica* 21: 235-248.

____ . 1986a. Ultrastructure, function and classification of microsporidia. *Progress Protistol.* 1: 325-390.

____ . 1986b. Sporogony of microsporidia: Ultrastructure features of taxonomic significance. Proc. 4th Int. Colloq. Invert. Pathol. Veldhoven. Pp 339-342.

Léger, L. 1987. Sur une nouvelle Myxosporidie de la famille des Glugeïdées. *C.R. Acad. Sci. Fr.* 125: 260-262.

Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honingberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D. Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., & F. Wallace. 1980. A *newly* revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.

Loubès, C. 1979. Ultrastructure, sexualite, dimorphisme sporogonique des microsporidies (Protozoaries). Incidences taxonomiques et biologiches. These Doctorat es Sciences, Universités des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier. 86 pp.

Lutz, A. & A. Splendore. 1904. Ueber Pebrine und verwandte mikrosporidien. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und infektionskrankheiten* I. 36: 645-650.

____ . 1908. Ueber Pebrine und verwandte mikrosporidien. Zweite Mitteilung. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* I. 46: 311-315.

Malone, L., Wigley, P & S. Dhana. 1987. Identity of a microsporidium from three New Zealand pasture insects: *Costelytra zealandica* (Coleoptera, Scarabeidae), *Wiseana* spp. (Lepidoptera, Hepialidae), and *Listronotus bonariensis* (Coleoptera, Curculionidae). *J. Invert. Pathol.* 49: 135-144.

Marino, G., Coscarón, S., Maurand, J., Loubès. C. & P. Cabeza Meckert. 1980. Estudios sobre microsporidios de la región neotropical. I. Sobre la presencia de *Pleistosphora simulii* (Lutz y Splendore) en la región austral de América (Microspora). *Neotrópica* 25: 127-132.

Maurand, J. 1967. Relations microsporidies-larves de *Simulium*:spécificité parasitaire d'hôte; spécificité parasitaire tissulaire. *Ann. Parasitol.* 42: 285-290.

____ . 1973. Recherches biologiques sur les microsporidies des larves de simulies. These Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques de Languedoc. Montpellier. 199 pp.

____ . 1975. Les microsporidies des larves de simulies: systématique, données cytochimiques, pathologiques et écologiques. *Ann. Parasitol.* 50: 371-396.

____ & **G. Bouix.** 1969. Mise en évidence d'un phénomene sécrétoire dans le cycle de *Thelohania fibrata*, microsporidie parasite des larves de *Simulium*. *C.R. Acad.Sci. Fr.* 269:2216-2218.

____ & **C. Loubès.** 1973. Recherches cytochimiques sur quelques microsporidies. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 98: 373-383.

__________ .1978. Les microsporidies des larves de simulies: données ultrastructurales. *Z. Parasitenkd.* 56: 131-146.

____ & **J.F. Manier** 1968a. Une microsporidie nouvelle pour les larves de simulies. *Protistologica* 3: 445-455.

__________ .1968b. Actions histopathologiques comparèes de parasites coelomiques des larves de simulies (Chytridiales, Microsporidies). *Ann. Parasitol.* 43: 79-85.

McLaughlin, R. 1971. Use of Protozoans for microbial control of insects. Pp 151-172 in Burges, H. & N. Hussey (Eds.) *Microbial control insects and mites*. Academic Press, London.

Moncada, L.I. & M.L. Bueno. 1977. Inventario específico y algunos aspectos biológicos de los simúlidos del río Teusacá. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 294 pp.

Roubaud, M. 1906. Simulies nouvelles de l'Amerique du Sud. *Bull. Mus. Hist. Nat. París* 12: 106-110.

Sprague, V. 1970. Taxonomy of microsporidia. *J. Protozool.* 56: 327.

____. 1977. Systematics of the Microsporidia. *Comp. Pathobiol.* 2: 1-510.

____ & S. **Vernick.** 1968. Light and electronmicroscope study of a new species of *Glugea* (Microsporida, Nosematidae) in the 4-Spined Stickleback *Apeltes quadracus. J. Protozool.* 15: 547-571.

____, **Tuzet, O. & J. Maurand.** 1977 In. Sprague 1977.

Stempell, W. 1909. Über *Nosema bombysis* Nägeli. *Arch. Protistenkd.* 16: 281-358.

Strickland, E. H. 1911. Some parasites of *Simulium* larvae and their effects on the development of the host. *Biol. Bull.* 21: 302-338.

____. 1913. Further observations on the parasites of *Simulium* larvae. *J. Morphol.* 24: 43-95.

Takaoka, H. 1980. Pathogens of blackfly larvae in Guatemala and their influence on natural populations of three species of onchocerciasis vestors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29: 467-472.

Thompson, H. 1960a. Variation of some of the characteristics used to distinguish between species of microsporidia. I. Spore size. *J. Insect. Pathol.* 2: 147-151.

____. 1960b. A list and brief description of the microsporidia infecting insects. *J. Insect. Pathol.* 2: 346-385.

Torres, O. 1988. Estudios preliminares de microsporidios y otros patógenos en larvas de simúlidos (Diptera:Simuliidae) de La Calera. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 109 pp.

____, **Muñoz de Hoyos, P. & G. Romero de Pérez.** 1991. Parasitismo en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) del río Teusacá: Microsporidios, Mermítidos y Hongos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 18 (69): 253-264.

Tuzet, O., Maurand, J., Fize, A., Michel, R. & B. Fenwich. 1971. Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les genres des Microsporidies. *C.R. Acad. Sci.*, *Paris* 272: 1268-1271.

Undeen, A.H. 1981. Microsporida infections in adult *Simulium vittatum. J. Invert. Pathol.* 38: 426-427.

____, **Vavra, J. & K.H. Rothfels.** 1984. The sex of larval simuliids infected with microsporidia. *J. Invert. Pathol.* 43: 126-127.

Vavra, J. & A. Undeen. 1981. Microsporidia (Microspora: Microsporida) from Newfoundland blackflies (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 59: 1431-1446.

Weiser, J. 1947. *Caudospora simulii*, n.g., n.sp.,microsporidie parasite des larves de *Simulium. Ann. Prasitol.* 22: 11-15.

____. 1958. Unterlagen der taxonomie de Mikrosporidien. Trans. Intern. Congr. Insect Pathol. and Biol. Control. Prague, 1958. pp.277-285.

____. 1960. *Theohania columbacensis* n. sp., a new microsporian of *Simulium reptans columbaczense* (Diptera: Simuliidae) *Vest. Cesk. Spol. Zool.* 24:196-198.

____. 1963. Sporozoan infection. Pp 291-334. in Steinhaus, E. (Ed.) *Insect pathology and advanced treastise.* Academic Press, London.

____. 1977. Contribution to the classification of microsporidia. *Vest. Cesk. Spol. Zool.* 41: 308-320.

____ & **J. Briggs.** 1971. Identification of pathogens. Pp 13-66. *In* Burges, H. & N. Hussey (Eds.) *Microbial Control of Insects and Mites.* Academic Press. London.

____ & **S. Prasertphon.** 1982. Microsporida infecting *Simulium damnosum* in Nigeria. *Z. Angew. Entomol.* 93: 93-101.

____ & **A. Undeen.** 1981. Diseases of blackflies. Pp 181-196 *in* Laird, M. (Ed.) *Blackflies: The future for biological methods in integrated control.* Academic Press. London.

Wygodzinsky, P. 1973. Diagnoses of new specie of *Gigantodax* Enderlein (Simuliidae: Diptera) from the northern Andes. *J. N. York Entomol. Soc.* 81: 243-246.

____ & **S. Coscarón.** 1973. A review of the Mesoamerican and South American black flies of the tribe Prosimuliini (Simuliinae, Simuliidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 151, 199 pp.